



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

PCT/EP200 4 / 0 1 2 0 9 0

Office européen  
des brevets

21 10. 2004

REC'D 24 NOV 2004

WIPO

PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-  
gen stimmen mit der  
ursprünglich eingereichten  
Fassung der auf dem näch-  
sten Blatt bezeichneten  
europäischen Patentanmel-  
dung überein.

The attached documents  
are exact copies of the  
European patent application  
described on the following  
page, as originally filed.

Les documents fixés à  
cette attestation sont  
conformes à la version  
initialement déposée de  
la demande de brevet  
européen spécifiée à la  
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

03090366.0

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

R C van Dijk



Anmeldung Nr:  
Application no.: 03090366.0  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 24.10.03  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Bayer CropScience GmbH  
Brüningstrasse 50  
65929 Frankfurt/Main  
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Verwendung von linearen Poly-alpha-1,4-Glukanen als resistente Stärke

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

A23L1/00

Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL  
PT RO SE SI SK TR LI

### **Verwendung von linearen Poly-alpha-1,4-Glukanen als resistente Stärke**

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von linearen alpha-1,4-Glukanen als resistente Stärke (RS) sowie ein Verfahren zur Herstellung resistenter Stärke, dadurch gekennzeichnet, dass man Saccharose mit einem Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase umsetzt.

Grundsätzlich werden alpha-Amylase-resistente Stärkestrukturen als „resistente Stärke“ (RS) bezeichnet werden. RS werden durch alpha-Amylasen nicht abgebaut. Resistente Stärken stellen in Lebensmitteln oder Lebensmittelzusammensetzungen aufgrund ihrer verminderten Metabolisierbarkeit eine energiereduzierte, körpergebende Komponente im Sinne eines Ballaststoffes dar.

Der Einsatz resistenter Stärke (RS) gewinnt in der Lebensmittelindustrie zunehmend an Bedeutung. Aus dem Abbau von RS-haltigen Produkten bezieht der Organismus nur in geringem Umfang Energie. Diese Energiezufuhr betrifft ausschließlich den oxidativen Abbau resorbierter kurzkettiger Fettsäuren aus dem Dickdarm. Diese kurzkettigen Fettsäuren sind Endprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels der intestinalen Mikroflora. Mit der Aufnahme RS-haltiger Lebensmittel werden Substrate für den Energiestoffwechsel der intestinalen Mikroflora und der Dickdarmepithelzellen bereitgestellt. Letztere sind zur Aufrechterhaltung ihrer Struktur und Funktion auf die luminale Zufuhr der kurzkettigen Fettsäuren und insbesondere von Butyrat angewiesen.

Hohe luminale Butyratspiegel im Dickdarm stellen einen Schutzfaktor gegen kolorektale Erkrankungen dar.

Es wird zwischen den folgenden Typen resistenter Stärke unterschieden:

- RS Typ 1    Physikalisch der Verdauung unzugängliche Stärke, z.B. in nicht aufgeschlossenen Pflanzenzellen (z.B. in Müsli).
- RS Typ 2    Unverdauliche granuläre Stärken (Stärkekörner), z.B. rohe Kartoffel, grüne Banane etc.
- RS Typ 3    Unverdauliche retrogradierte Stärke, die z.B. durch thermische und/oder enzymatische Behandlung gewonnen und anschließend retrogradiert wurde.
- RS Typ 4    Unverdauliche chemisch modifizierte Stärke, die z.B. durch Quervernetzung oder Veresterung (Acetylierung etc.) entstanden ist.

Charakteristisch für RS Typ 3 ist, dass es sich hierbei um eine resistente Stärke handelt, die durch Retrogradation entstanden ist. Bei der Retrogradation (auch: Retrogradierung oder Rekristallisation) verkleisterter Stärken bilden sich mikrokristalline Strukturen aus, die einer enzymatischen Hydrolyse durch alpha-Amylasen nicht zugänglich sind.

Aus US 3,729,380 ist bekannt, dass der Anteil an hochverzweigtem Amylopektin durch enzymatische Behandlung mit Entzweigungsenzymen reduziert werden kann und derartig entzweigte Stärke eine starke Tendenz zur Retrogradation als native Stärke besitzt.

EP-A1-0 564 893 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung eines RS-haltigen Produkts, indem eine etwa 15%ige wäßrige Suspension einer Stärke, die zu mindestens 40 % aus Amylose besteht, verkleistert, mit einem Entzweigungsenzym behandelt und das entstandene Zwischenprodukt anschließend retrogradiert wird. Das Produkt enthält mindestens 15 % RS. Wird in diesem Verfahren eine Stärke mit einem Amyloseanteil von 100% eingesetzt, so enthält das Produkt etwa 50% RS.

EP-A1-0 688 872 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung eines 25 bis 50%igen RS-haltigen Produktes aus einer ca. 20%igen wäßrigen Suspension einer sog. „partiell abgebauten“, verkleisterten Stärke bzw. eines Maltodextrins, welche bzw. welches enzymatisch entzweigt und retrogradiert wird. In dem Verfahren wird als Ausgangsmaterial eine Stärke mit einem Amyloseanteil von weniger als 40% eingesetzt.

Als „partiell abgebaute“ Stärke wird in der EP-A1-0 688 872 eine Stärke bezeichnet, die durch geeignete physikalische oder chemische Behandlung in ihrem Molekulargewicht reduziert wurde, wobei die Verkürzung der Kettenlänge sowohl die Amylose als auch das Amylopektin betrifft. Die Verkürzung der Kettenlänge kann dabei sowohl durch Hydrolyseprozesse (säure- oder enzymkatalysierte), als auch durch Extrusion, Oxidation oder Pyrolyse erfolgen. Das durch Retrogradation des Abbauproduktes erhaltene Produkt wird durch Sprühtrocknung getrocknet. Das pulverförmige Produkt enthält einen RS-Anteil von mehr als 50% RS.

In der EP-A-0846704 wird eine retrogradierte Stärke beschrieben, die einen RS-Anteil von mehr als 55% aufweist und eine DSC-Schmelztemperatur von unter 115°C aufweist.

Die internationale Patentanmeldung WO 00/02926-A1 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung alpha-Amylase resistenter Polysaccharide, worin wasserunlösliche Poly-alpha-1,4-Glukane in Wasser suspendiert oder dispergiert werden, die erhaltene Suspension bzw. Dispersion erwärmt, der hierbei erhaltene Kleister abgekühlt wird, und der Kleister bei einer gegenüber der Temperatur des erhitzten Kleisters erniedrigten Temperatur retrogradiert wird. Hierbei werden RS-Produkte mit einem RS-Gehalt von mehr als 65% erhalten.

Schmiedl et al. (Carbohydrate Polymers 43, (2000), 183-193) beschreiben ferner die butyrogene Wirkung von resistenten Stärken des Typs 3 (in der Publikation von Schmiedl et al. als „resistant starch type III“ bezeichnet), die aus alpha-1,4-Glukanen hergestellt wurden.

Die Offenbarung der internationalen Patentanmeldung WO 00/38537-A1 baut auf der WO 00/02926-A1 auf. Die WO 00/38537-A1 beschreibt Zusammensetzungen, die u.a. eine resistente Stärke enthält, die gemäß der Offenbarung der WO 00/02926-A1 erzeugt worden ist. Die WO 00/38537-A1 beschreibt, dass die Bildung der in den Zusammensetzungen eingesetzten resistenten Stärke durch Retrogradation der

„nichtresistenten“ wasserunlöslichen linearen alpha-1,4-D-Glukane erfolgt und dass die „nichtresistenten“ wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane nur nach Retrogradation resistente Stärke ergeben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Stand der Technik für die Herstellung nicht-granulärer, nicht chemisch modifizierter resistenter Stärken lehrt, dass sich resistente Stärkestrukturen dann ausbilden, wenn man die Polysaccharide einem zusätzlichen Retrogradationsprozeß unterzieht, der in der Regel aufwendig und kostenintensiv ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, auf kostengünstigem Wege Polysaccharide zur Verfügung zu stellen, die als resistente Stärke eingesetzt werden können.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher die Verwendung von wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen als resistente Stärke (RS).

Es wurde überraschenderweise festgestellt, dass wasserunlösliche lineare alpha-1,4-D-Glukane auch ohne einen oder mehrere zusätzliche Retrogradationsschritte als resistente Stärke eingesetzt werden können.

Die internationale Patentanmeldung WO 00/38537– A1 lehrt, dass eine aus einem wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-Glukan erhältliche resistente Stärke nur durch Retrogradation der „nichtresistenten“ wasserunlöslichen linearen alpha-1,4-D-Glukane erhalten werden kann.

Es wurde nun überraschenderweise festgestellt, dass die in der WO 00/38537–A1 beschriebenen wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-Glukane, die dort als Ausgangsmaterial zur Herstellung resistenter Stärken mittels Retrogradation eingesetzt werden und dort ausdrücklich als „nichtresistente“ Glukane bezeichnet werden,

überraschenderweise bereits selbst resistente Stärken darstellen. D.h., die vorliegende Erfindung stellt auf kostengünstigem Wege resistente Stärken zur Verfügung, deren Herstellung keinen zeit- und kostenintensiven Retrogradationsschritt vorsieht. Das Wegfallen des Retrogradationsschritts stellt einen wesentlichen Vorteil gegenüber dem in der WO 00/02926-A1 beschriebenen Verfahren zur Herstellung resistenter Stärken dar, in welchem die Poly-alpha-1,4-Glukane aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit erst bei hohen Temperaturen und/oder erhöhtem Druck in Lösung gebracht werden müssen, bevor sie anschließend retrogradiert werden können. Der Einsatz erhöhter Temperaturen und/oder Drücke ist sehr energie- und somit kostenintensiv.

Unter dem Begriff „resistente Stärke“ bzw. „RS“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Polysaccharid verstanden werden, das aus wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-Glukane besteht und dem Abbau durch alpha-Amylasen nicht zugänglich ist. Die erfindungsgemäß zu verwendende „resistente Stärke“ ist weder eine granuläre des RS Typ 2), noch eine retrogradierte (RS Typ 3) noch eine chemisch modifizierte Stärke (RS Typ 4) und stellt somit einen neuen Typ an resistenter Stärke dar, der daher im folgenden als RS Typ 5 bezeichnet werden soll.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung werden die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane enzymatisch hergestellt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung werden die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane durch die Umsetzung einer wäßrigen Saccharoselösung mit einem Enzym mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase gewonnen.

Unter dem Begriff „wasserunlöslich“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Poly-alpha-1,4-D-Glukane verstanden werden, die nach der Definition des Deutschen Arzneimittelbuches (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Gori-Verlag GmbH, Frankfurt, 9. Auflage, (1987)) entsprechend den Klassen 4-7 unter die Kategorien „wenig löslich“, „schwer löslich“, „sehr schwer löslich“ und „praktisch unlöslich“ fallen.

Die Wasserunlöslichkeit der erfindungsgemäß eingesetzten Poly-alpha-1,4-D-Glukane ist vorzugsweise derart, dass wenigstens 98%, insbesondere wenigstens 99.5% der eingesetzten Polysaccharide unter Normalbedingungen (Temperatur = 25°C +/- 20%; Druck = 101325 Pascal +/- 20%) in Wasser unlöslich sind (entsprechend mindestens den Klassen 4 und 5 nach der Definition des Deutschen Arzneimittelbuches).

Dem Fachmann sind Methoden zur Bestimmung der Löslichkeit der Poly-alpha-1,4-D-Glukane bekannt.

Unter dem Begriff „linear“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Poly-alpha-1,4-D-Glukane verstanden werden, die keine Verzweigungen aufweisen oder deren Verzweigungsgrad so minimal ist, dass er mit herkömmlichen Methoden, wie beispielsweise der  $^{13}\text{C}$  -NMR- Spektroskopie nicht nachweisbar ist.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung versteht man unter einer „wäßrigen Saccharoselösung“ eine wäßrige Lösung, die frei von Puffersalzen sein kann, vorzugsweise jedoch Puffersalze enthält, mit einer Saccharosekonzentration in einem Bereich liegt zwischen 0.5 Gew.-% - 80% Gew.-%, vorzugsweise in einem Bereich zwischen 5% Gew.-% - 60% Gew.-%, weiterhin bevorzugt in einem Bereich zwischen 10 Gew.-% - 50% Gew.-%, und besonders bevorzugt in einem Bereich zwischen 20 Gew.-% - 30% Gew.-%.

Unter einem „Enzym mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase“ versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Enzym, das die folgenden Reaktionen katalysiert:

1. Saccharose + Saccharose  $\leftrightarrow$  Oligo-(alpha-1,4-Glukan)<sub>n</sub> + Fruktose
2. Oligo-(alpha-1,4-Glukan)<sub>n</sub> + Saccharose  $\leftrightarrow$  Poly-(alpha-1,4-Glukan)<sub>n+1</sub> + Fruktose



Ausgehend von diesem Reaktionsschema können lineare oligomere oder polymere alpha-1,4-Glukane als Akzeptoren für eine kettenverlängernde Reaktion dienen, die zu erfindungsgemäß zu verwendenden wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen führt, deren Glukosereste durch alpha-1,4-glykosidische Bindungen verknüpft sind und die ein mittleres Molekulargewicht im Bereich von  $0.75 \times 10^2$  g/mol bis  $10^7$  g/mol, bevorzugt von  $1 \times 10^2$  g/mol bis  $10^5$  g/mol und besonders bevorzugt von  $1 \times 10^3$  g/mol bis  $3 \times 10^4$  g/mol, ganz besonders bevorzugt zwischen  $2 \times 10^3$  g/mol bis  $1.2 \times 10^4$  g/mol aufweisen.

Diese linearen oligomeren oder polymeren alpha -1,4-Glukan-Akzeptoren können dabei von außen zugesetzt werden, vorzugsweise werden sie jedoch wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben durch die Amylosucrase selbst aus Saccharose erzeugt.

Verzweigungen, z.B. alpha-1,6-glykosidische Bindungen, sind in diesen Produkten, die durch die Umsetzung einer wäßrigen Saccharoselösung mit einem Enzym mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase gewonnen wurden, per  $^{13}\text{C}$ -NMR nicht nachweisbar (Remaud-Simeon et al. in „Carbohydrate Bioengineering“ (ed. S. B. Petersen et al.), Elsevier Science B.V.(1995), 313-320).

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann im Prinzip jede beliebige Amylosucrase eingesetzt werden. Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase sind dem Fachmann bekannt. Vorzugsweise stammen die erfindungsgemäß einzusetzenden Amylosucrasen aus Mikroorganismen, vorzugsweise aus Bakterien der Gattung *Neisseria*, besonders bevorzugt stammt die Amylosucrase aus *Neisseria polysaccharea*.

Das US-Patent US 6265635-B1, die internationale Patentanmeldung WO 00/14249-A1 sowie Potocki de Montalk et al. (Journal of Bacteriology 181 (2), (1999), 375-381) beschreiben beispielsweise DNA-Sequenzen, die ein Amylosucraseprotein aus *Neisseria polysaccharea* codieren, das im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bevorzugt ist. Ferner wurde das Vorliegen von Proteinen mit Amylosucrase-

Aktivität für eine Reihe weiterer *Neisseria* Spezies beschrieben, wie z.B. für *Neisseria perflava* (Okada and Hehre, J. Biol. Chem. 249, (1974), 126-135), MacKenzie et al., Can. J. Microbiol. 23, (1977), 1303-1307), *Neisseria canis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria denitrificans*, *Neisseria sicca*, *Neisseria subflava* (MacKenzie et al., Can. J. Microbiol. 24, (1978), 357-362).

Eine DNA-Sequenz kodierend für ein Amylosucraseprotein aus *Caulobacter crescentus* CB 15 ist beschrieben in Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:4136-4141, die DNA- und Protein-Sequenzinformationen sind verfügbar in der EMBL Datenbank (<http://srs.ebi.ac.uk>) unter ID No. AE005791 und Protein\_id AAK23119.1.

Auch aus *Neisseria meningitidis* Stamm 93246 ist eine Amylosucrase bekannt, deren DNA- und Aminosäuresequenz ist zugänglich unter ID AY099334 und Protein\_id AAM51152.1 der EMBL Datenbank.

Ferner ist eine DNA-Sequenz aus *Deinococcus radiodurans* R1 bekannt (NCBI Genbank Accession Number NP\_294657, dort als alpha-Amylase bezeichnet), die für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase codiert.

Mit Hilfe dieser DNA- und Aminosäuresequenzinformationen der Amylosucrasen, vorzugsweise mit Hilfe der in der WO 00/14249-A1 beschriebenen Sequenzinformationen ist es dem Fachmann nun möglich, homologe Sequenzen aus anderen Organismen, vorzugsweise aus Mikroorganismen, zu isolieren. Dies kann beispielsweise mit Hilfe konventioneller Methoden, wie z.B. dem Durchmustern von genomischen Banken mit geeigneten Hybridisierungsproben erfolgen. Dem Fachmann ist bekannt, dass die Isolierung homologer Sequenzen auch mit Hilfe von (degenerierten) Oligonukleotiden und der Verwendung von PCR basierten Methoden erfolgen kann.

Auch die Durchmusterung von Datenbanken, wie sie z.B. von EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.htm>) oder NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zur Verfügung gestellt werden, kann zur Identifizierung homologer Sequenzen, die für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität

einer Amylosucrase codieren, dienen. Hierbei wird eine oder werden mehrere Sequenzen als sogenannte Abfrage (= query) vorgegeben. Diese Abfragesequenz wird dann mittels statistischen Computerprogrammen mit Sequenzen, die in den ausgewählten Datenbanken enthalten sind, verglichen. Solche Datenbankabfragen (z.B. blast oder fasta searches) sind dem Fachmann bekannt und können bei verschiedenen Anbietern durchgeführt werden.

Wird eine solche Datenbankabfrage z.B. beim NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt, so sollen die Standardeinstellungen, die für die jeweilige Vergleichsanfrage vorgegeben sind, benutzt werden.

Für Proteinsequenzvergleiche (blastp) sind dies folgende Einstellungen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11, Extension = 1.

Für Nucleinsäuresequenzvergleich (blastn) sind folgende Parameter einzustellen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 11.

Bei einer solchen Datenbankrecherche können z.B. die DNA- und Aminosäuresequenzinformationen der Amylosucrasen, die in der WO 00/14249-A1 beschriebenen Sequenzinformationen als Abfragesequenz (query) verwendet werden, um weitere Nucleinsäuremoleküle und/oder Proteine zu identifizieren, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase codieren.

Die enzymatische Aktivität eines Proteins mit Amylosucraseaktivität kann sehr einfach nachgewiesen werden durch Expression des Amylosucrasegens in *E. coli* und anschließende Blaufärbung der *E. coli*-Zellen mit Iod, wie beispielsweise beschrieben in Beispiel 6 der internationalen Patentanmeldung WO 95/31553-A1.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung erfolgt die Umsetzung der wäßrigen Saccharoselösung mit einem Enzym mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase *in vitro*.

Die internationale Patentanmeldungen WO 99/67412-A1 (Beispiel 3) (korrespondiert zu US-Anmeldung US 20020052029-A1), WO 00/38537-A1 (Beispiel 1) sowie de Montalk et al. (FEBS letters 471, (2000), 219-223) beispielsweise offenbaren Verfahren zur *in vitro*-Herstellung von Poly-alpha-1,4-D-Glukanen mittels Amylosucrase. Auf die Offenbarung dieser Dokumente wird sich hier ausdrücklich bezogen. Ferner wird in Beispiel 1 der vorliegenden Patentanmeldung ein *in vitro*-Verfahren zur Herstellung von Poly-alpha-1,4-D-Glukanen beschrieben.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt die *in vitro*-Herstellung von Poly-alpha-1,4-D-Glukanen mittels einer gereinigten Amylosucrase. Unter einer gereinigten Amylosucrase wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Enzym verstanden, das weitgehend frei ist von Zellbestandteilen, in denen das Protein synthetisiert wird. Vorzugsweise bedeutet der Begriff „gereinigte Amylosucrase“ eine Amylosucrase, die frei von störenden enzymatischen Aktivitäten (z.B. Verzweigungsenzymaktivitäten) ist. Vorzugsweise weist die „gereinigte Amylosucrase“ einen Reinheitsgrad von mindestens 80%, bevorzugt von mindestens 90% und besonders bevorzugt von mindestens 95% auf.

Verfahren zur Aufreinigung der Amylosucrase sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise beschrieben in der internationalen Patentanmeldung WO99/67412-A1 (Beispiel 1).

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt die *in vitro*-Herstellung von Poly-alpha-1,4-D-Glukanen mittels Amylosucrase in Anwesenheit externer linearer Glucosylgruppenakzeptoren. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter dem Begriff eines „externen linearen Glucosylgruppenakzeptors“ ein lineares Oligo- oder Polysaccharid, wie z.B. Maltopentaose, Maltohexaose, Maltoheptaose, verstanden werden, das dem *in vitro*-Ansatz von außen zugesetzt wird und das in der Lage ist, die Anfangsgeschwindigkeit der Umsetzung der Saccharose durch die Amylosucrase zu erhöhen.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt die *in vitro*-Herstellung von Poly-alpha-1,4-D-Glukanen mittels Amylosucrase in Abwesenheit externer verzweigter Glucosylgruppenakzeptoren. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter dem Begriff eines „externen verzweigten Glucosylgruppenakzeptors“ ein verzweigtes Kohlenhydrat-Molekül verstanden werden, wie z.B. Glykogen oder Amylopektin, das dem *in vitro*-Ansatz entweder von außen zugesetzt wird oder im Reaktionsgemisch, z.B. als Bestandteil des Amylosucrase-Enzymextraktes, bereits vorhanden ist und das in der Lage ist, die Anfangsgeschwindigkeit der Umsetzung der Saccharose durch die Amylosucrase zu erhöhen.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung erfolgt die Umsetzung der wäßrigen Saccharoselösung mit einem Enzym mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase *in planta*.

Die internationale Patentanmeldung WO 95/31553-A1 und das hierzu korrespondierende US-Patent US 6265635-B1 offenbaren Verfahren zur *in planta*-Herstellung von Poly-alpha-1,4-D-Glukanen mittels Amylosucrase. Auf die Offenbarung dieser Patentanmeldung bzw. Patents wird sich hier ausdrücklich bezogen.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung erfolgt die enzymatische Herstellung der Poly-alpha-1,4-D-Glukane durch ein Enzym mit der enzymatischen Aktivität einer Amylomaltase.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung versteht man unter einer „Amylomaltase“ ein Enzym [E.C.2.4.1.3], das die Umsetzung von Maltose zu Maltotriose und Glukose katalysiert und das bei Entfernen der Glukose aus dem Reaktionsgleichgewicht, beispielsweise durch Oxidation der Glukose, die Synthese von Poly-alpha-1,4-D-Glukanen katalysiert (Palmer et al. FEBS Letters 1, (1968), 1-3).

Auch wasserunlösliche lineare Poly-alpha-1,4-D-Glukane, die die hier beschriebenen Eigenschaften (wasserunlöslich, keine Verzweigungen, Molekulargewicht zwischen  $10^2$

g/mol und  $10^7$  g/mol) aufweisen, aber auf anderem Wege erzeugt worden sind, können Ausgangsstoffe der erfindungsgemäßen Verwendung sein.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung weisen die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane einen nach der Methode von Englyst et al. (European Journal of Clinical Nutrition 46, (Suppl.23), (1992), S33-S50) bestimmten RS-Gehalt von mehr als 70 Gew.-% auf. Die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung vorzugsweise einzusetzende Methode zur Bestimmung des RS-Gehaltes von Englyst et al. wird in Beispiel 1 beschrieben.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen die erfindungsgemäß zu verwendenden wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane einen nach der Methode von Englyst et al. bestimmten RS-Gehalt von mehr als 75 Gew.-%, vorzugsweise von mehr als 80 Gew.-% und besonders bevorzugt von mehr als 85 Gew.-% auf.

Die erfindungsgemäß zu verwendenden Poly-alpha-1,4-D-Glukane weisen hohe RS-Gehalte auf. Für den Fachmann ist das völlig überraschend, da er aufgrund des Offenbarungsgehaltes der WO 00/38537- A1 davon ausgehen musste, dass die erfindungsgemäß zu verwendenden Poly-alpha-1,4-D-Glukane „nichtresistente“ Strukturen ausbilden, d.h. Strukturen, die dem Abbau durch alpha-Amylasen zugänglich sind.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass die erfindungsgemäß zu verwendenden Poly-alpha-1,4-D-Glukane entgegen der Offenbarung der WO 00/38537- A1 bereits RS-Gehalte von mehr als 70 Gew.-%, vorzugsweise von mehr als 80% und besonders bevorzugt von mehr als 85 Gew.-% aufweisen, ohne dass man sie einem zusätzlichen Retrogradationsschritt unterzieht.

Unter „Retrogradation“ (auch: Retrogradierung oder Rekristallisation) soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Verfahren verstanden werden, das aus mindestens einem Aufheizschritt und mindestens einem Abkühlschritt einer

Polysaccharidsuspension oder Polysacchariddispersion besteht. Während des Aufheizschrittes verkleistert die Polysaccharidsuspension oder Polysacchariddispersion, während des Abkühlenschrittes bilden sich mikrokristalline Strukturen aus, die einer enzymatischen Hydrolyse durch alpha-Amylasen nicht zugänglich sind.

Ferner wurde gefunden, dass die erfindungsgemäß zu verwendenden Poly-alpha-1,4-D-Glukane im Dickdarm die Bildung von kurzkettigen Fettsäuren, insbesondere von Butyrat fördern und somit geeignet sind für den Einsatz als Nahrungsergänzungsmittel zur Prävention kolorektaler Erkrankungen.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung weisen die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane eine DSC-Peaktemperatur zwischen 95°C und 125°C, vorzugsweise zwischen 100°C und 120°C, besonders bevorzugt zwischen 105°C und 116°C auf.

Die Methode der „Differential Scanning Calometrie“ (DSC) ist dem Fachmann bekannt. Ergebnisse von DSC-Messungen werden zur Charakterisierung der thermischen Stabilität der RS-Produkte genutzt. Die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung vorzugsweise zu verwendende DSC-Methode wird in Beispiel 3 der vorliegenden Patentanmeldung beschrieben.

Die endothermen Peaks der DSC-Messung sind durch verschiedene Parameter ( $T_O$ ,  $T_P$ ,  $T_C$  und  $dH$ ) näher charakterisiert. Die onset-Temperatur  $T_O$  kennzeichnet den Beginn der thermischen Umwandlung. Am Wert für  $T_P$  ( $T_P$  = DSC Peaktemperatur) ist die Temperatur ablesbar, bei der die maximale thermische Umsetzung des kristallinen Materials erfolgt, während  $T_C$  die Temperatur darstellt, bei der der Umwandlungsprozeß abgeschlossen ist (Endtemperatur).

Die Umwandlungsenergie  $dH$  (Umwandlungsenthalpie) wird durch Berechnung der Peakfläche ermittelt. Sie stellt die Gesamtenergie dar, für die für Transformation notwendig ist.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung weisen die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane eine DSC-Umwandlungsenthalpie  $dH$  von 10 J/g – 30 J/g, vorzugsweise von 11 J/g – 25 J/g und besonders bevorzugt von 20 J/g – 24 J/g auf.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung werden die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane nicht modifiziert, vorzugsweise nicht retrogradiert.

Der Begriff „nicht modifiziert“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die erfindungsgemäß zu verwendenden Poly-alpha-1,4-D-Glukane, die enzymatisch erzeugt werden, vorzugsweise durch Umsetzung einer wäßrigen Saccharoselösung durch eine Amylosucrase, nach der enzymatischen Herstellung und der Isolierung der Poly-alpha-1,4-D-Glukane nicht nachträglich chemisch und/oder physikalisch modifiziert werden, vorzugsweise nicht retrogradiert werden.

Diese Vorgehensweise bietet den Vorteil, dass kosten- und zeitintensive Retrogradationsschritte entfallen im Gegensatz zu den im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Herstellung von resistenten Stärken, insbesondere von RS Typ 3 Stärken.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von leicht verzweigten wasserunlöslichen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen als resistente Stärke.

Unter dem Begriff „leicht verzweigt“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Verzweigungsgrad von weniger als 1%, vorzugsweise von weniger als 0.5% und besonders bevorzugt von weniger als 0.25% verstanden werden.

Die Bestimmung des Verzweigungsgrades erfolgt vorzugsweise mittels  $^{13}\text{C}$  -NMR-Spektroskopie.



Die Verzweigungen können in 2- oder 3-Position auftreten, vorzugsweise in 6-Position. Sie können durch chemische Modifikation, wie z.B. durch Veretherung oder Veresterung, entstanden sein oder durch enzymatische Modifikation, beispielsweise durch ein Verzweigungsenzym.

Vorzugsweise werden die leicht verzweigten wasserunlöslichen Poly-alpha-1,4-D-Glukane nicht modifiziert, besonders bevorzugt nicht retrogradiert.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung resistenter Stärke umfassend folgende Verfahrensschritte:

- a) Herstellung einer wäßrigen Saccharoselösung;
- b) Umsetzung der wäßrigen Saccharoselösung mit einem Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase zu wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen; und optional
- c) Isolierung wasserunlöslicher linearer Poly-alpha-1,4-D-Glukane.

Die Herstellung einer wäßrigen Saccharoselösung ist dem Fachmann bekannt. Geeignete wäßrige Saccharoselösungen wurden bereits im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Verwendung beschrieben.

Die Umsetzung gemäß Verfahrensschritt b) wurde ebenfalls bereits oben im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Verwendung beschrieben.

Dem Fachmann sind ebenfalls Methoden bekannt, wie er die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane, welche resistente Stärken RS Typ 5 sind, isolieren kann. Die Eigenschaften der erfindungsgemäß zu verwendenden wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane sind bereits oben im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Verwendung beschrieben worden.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane nach der Isolierung getrocknet. Sie können beispielsweise gefriergetrocknet, luftgetrocknet oder sprühgetrocknet werden.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung resistenter Stärke.

Die folgenden Beispiele dienen zur näheren Erläuterung der Erfindung, ohne diese auf die Beispiele zu begrenzen.

### **Allgemeine Methoden**

#### **1. Herstellung von wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen**

Die Herstellung von wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen ist z.B. beschrieben in WO 00 44492, WO 00 02926, WO 00 38537, WO 99 67412 oder WO 01 42309.

#### **2. Reinigung von Amylosucrase**

Ein Protokoll zur Reinigung eines Proteins mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase ist beschrieben in WO 99 67412.

#### **3. Expression eines Proteins mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase**

Die Expression eines Proteins mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase in Bakterienzellen ist u.a. beschrieben bei Potocki de Montalk et al. (2000, FEMS Microbiology Letters 186, 103-10) und Potocki de Montalk et al. (1999, J. of Bacteriology 181, 357-381).

### **Beispiel 1**

#### **Bestimmung des RS-Gehaltes von wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen**

Der RS-Gehalt von wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen, hergestellt durch die Umsetzung von Saccharose durch ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase, wurde basierend auf der Methode nach Englyst (European Journal

of Clinical Nutrition (1992) 46 (suppl.2), S.33-50) zur Bestimmung Resistenter Stärke Typ III ermittelt. Dabei wurde die Methode von Englyst entsprechend den Angaben zur Bestimmung des RS-Gehaltes in WO 00 02926 modifiziert.

#### a) Pankreatin/Amyloglucosidase (AGS)-Behandlung

Verwendeter Puffer des Pankreatin/Amyloglucosidase\_Verdaus:

0,1M Na-Acetat pH 5,2

4mM CaCl<sub>2</sub>

Herstellung der Enzymlösung:

12g Pankreatin (Merck, Prod. Nr. 1.07130.1000) werden in 80ml demineralisiertem Wasser (Leitfähigkeit ca. 18 M Ohm) für 10min bei 37°C gerührt und anschließend für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert.

54ml des nach der Zentrifugation erhaltenen Überstandes werden mit 9,86ml demineralisiertem Wasser und 0,14ml Amyloglucosidase (6000u/ml, Sigma, Prod. Nr.A-3042) versetzt.

Durchführung des Pankreatin/Amyloglucosidase (AGS)-Verdaus

Für jede zu messende Charge wasserunlöslicher linearer Poly-alpha-1,4-D-Glukane werden jeweils 5 Ansätze für den Pankreatin/Amyloglucosidase (AGS)-Verdau vorbereitet. Zu jeweils 2 dieser 5 Ansätze wird später keine Enzymlösung zugegeben. Die Ansätze, bei welchen keine Enzymlösung zugegeben wird, werden als Referenz bezeichnet und dienen der Bestimmung der Wiederfindungsrate. Die verbleibenden 3 Ansätze werden als Probe bezeichnet, später mit Enzymlösung behandelt und dienen zur Bestimmung des RS-Gehaltes der betreffenden wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane.

Parallel wurden einige Reaktionsgefäße, die kein wasserunlösliches lineares Poly-alpha-1,4-D-Glukane enthielten (Blindprobe), mitgeführt. Diese keine wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane enthaltenden Blindproben dienen zur Ermittlung der Menge an copräzipitierendem Material (Protein, Salze).

Es wurde das Leergewicht von 50 ml Reaktionsgefäßen (Falcon Röhrchen) bestimmt und nachfolgend jeweils ca. 200 mg der wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane eingewogen.

Zur den wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen der Proben und der Blindproben wurden je 15 ml und zu den Referenzen je 20 ml Na-Acetat-Puffer (siehe oben) zugegeben. Diese Ansätze wurden bei 37°C vorgewärmt.

Die Reaktion wird durch Zugabe von jeweils 5 ml Enzymlösung zu den einzelnen Reaktionsgefäßen der Proben und der Blindproben gestartet und anschließend für 2 Stunden bei 37°C geschüttelt (200 U/min).

Das Abstoppen der Reaktion erfolgte bei den Proben, Blindproben und Referenzen durch Zugabe von 5ml Eisessig (equilbriert auf pH 3,0) und 80 ml technischem Ethanol. Durch Inkubation der gestoppten Reaktionsansätze für 1 Stunde bei Raumtemperatur erfolgte die Ausfällung der wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane aus dem Reaktionsgemisch.

Nach Sedimentation (Zentrifugation für 10 min bei 2500 x g) wurde das erhaltene Sediment der einzelnen Reaktionsansätze zur Entfernung kurzkettiger Glukane zweimal mit 80%igem Ethanol gewaschen und anschließend nach Einfrieren bei -70°C gefriergetrocknet.

Die Proben wurden erneut gewogen und die Gewichts differenzen für die Berechnung der „gravimetrischen“ RS-Werte verwendet.

#### b) Ermittlung des RS-Gehaltes

Zur Bestimmung des RS-Gehaltes der einzelnen Chargen wasserunlöslicher linearer Poly-alpha-1,4-D-Glukane wurde wie folgt vorgegangen:

- a) Ermittlung des Wassergehaltes der einzelnen Probenchargen linearer Poly-alpha-1,4-D-Glukane (Gew.H<sub>2</sub>O)
- b) Bestimmung des Leergewichtes der einzelnen Reaktionsgefäße für die jeweiligen Proben (Gew.RGP), Referenzen (Gew.RGR) und Blindproben (Gew.RGB).
- c) Einwaage von ca. 200 mg wasserunlöslichem linearem Poly-alpha-1,4-D-Glukan in die einzelnen Reaktionsgefäße für Proben (Gew.P) und Referenzen (Gew.R)
- d) Berechnung des Trockenanteiles der Einwaage für

Proben ( $\text{Gew.P}_{\text{tr}} = \text{Gew.P} - \text{Gew.H}_2\text{O}$ ) und Referenzen  
 ( $\text{Gew.R}_{\text{tr}} = \text{Gew.P} - \text{Gew.H}_2\text{O}$ )

- e) Enzymatischer Verdau der jeweiligen Proben und Blindproben. Referenzen werden in gleicher Weise behandelt, jedoch ohne die Zugabe von Enzymlösung.
- f) Fällung, Sedimentation, Waschung und Gefriertrocknung der nach der unter e) beschriebenen Behandlung verbleibenden Substanzen in den Reaktionsgefäßen der Proben, Referenzen und Blindproben.
- g) Wiegen der nach der unter f) beschriebenen Behandlung verbleibenden Substanzen in den Reaktionsgefäßen der Proben ( $\text{Gew.PR}_G$ ), Referenzen ( $\text{Gew.RR}_G$ ) und Blindproben ( $\text{Gew.BR}_G$ ) inklusive Reaktionsgefäß.
- h) Berechnung des Gewichtes nach der unter f) beschriebenen Behandlung verbleibenden Substanzen in den Reaktionsgefäßen der Proben ( $\text{Gew.P}_{\text{nv}} = \text{Gew.PR}_G - \text{Gew.RG}_P$ ), der Referenzen ( $\text{Gew.R}_{\text{nv}} = \text{Gew.RR}_G - \text{Gew.RGR}$ ) und der Blindproben ( $\text{Gew.B}_{\text{nv}} = \text{Gew.BR}_G - \text{Gew.RGB}$ ).
- i) Bestimmung des Wassergehaltes der nach der unter f) beschriebenen Behandlung verbleibenden Substanzen in den Reaktionsgefäßen der Proben ( $\text{Gew.H}_2\text{OP}_{\text{nv}}$ ), der Referenzen ( $\text{Gew.H}_2\text{OR}_{\text{nv}}$ ) und der Blindproben ( $\text{Gew.H}_2\text{OB}_{\text{nv}}$ ).
- j) Berechnung des Trockenanteiles der nach der unter f) beschriebenen Behandlung verbleibenden Substanzen in den Reaktionsgefäßen der Proben ( $\text{Gew.P}_{\text{nv}_{\text{tr}}} = \text{Gew.P}_{\text{nv}} - \text{Gew.H}_2\text{OP}_{\text{nv}}$ ), der Referenzen ( $\text{Gew.R}_{\text{nv}_{\text{tr}}} = \text{Gew.R}_{\text{nv}} - \text{Gew.H}_2\text{OR}_{\text{nv}}$ ) und der Blindproben ( $\text{Gew.B}_{\text{nv}_{\text{tr}}} = \text{Gew.B}_{\text{nv}} - \text{Gew.H}_2\text{OB}_{\text{nv}}$ ).
- k) Bestimmung der korrigierten Gewichte für die Proben ( $\text{Gew.P}_{\text{nv}_{\text{kor}} = \text{Gew.P}_{\text{nv}_{\text{tr}}} - \text{Gew.B}_{\text{nv}_{\text{tr}}}$ ) und Referenzen ( $\text{Gew.R}_{\text{nv}_{\text{kor}} = \text{Gew.R}_{\text{nv}_{\text{tr}}} - \text{Gew.B}_{\text{nv}_{\text{tr}}}$ ).
- l) Berechnung des prozentualen Anteils der korrigierten Gewichte der verbleibenden wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane nach enzymatischem Verdau bezogen auf das Trockengewicht der Ausgangsmenge der Proben ( $\text{RSaP} = \text{Gew.P}_{\text{nv}_{\text{kor}}} / \text{Gew.P}_{\text{tr}} \times 100$ )

und Berechnung des prozentualen Anteils der korrigierten Gewichte der verbleibenden wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane der Referenzen bezogen auf das Trockengewicht der Ausgangsmenge der Referenzen ( $RSaR = \text{Gew.}R_{nv_{\text{korr}}} / \text{Gew.}R_{tr} \times 100$ )

- m) Bestimmung der Mittelwerte der prozentualen Anteile der verbleibenden wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen nach enzymatischem Verdau der Proben ( $RSaPMW = n \times RSaP / n$ )

und Bestimmung der Mittelwerte der prozentualen Anteile der verbleibenden wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen der Referenzen; (Wiederfindungsrate;  $RSaRMW = n \times RSaR / n$ )

n ist dabei die Anzahl der durchgeführten Proben-, bzw. Referenz-Ansätze für die jeweils untersuchte Charge von wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen.

- n) Bestimmung des prozentualen RS-Gehaltes der einzelnen Chargen wasserunlöslicher linearer Poly-alpha-1,4-D-Glukane durch Korrektur der Mittelwerte der prozentualen Anteile der verbleibenden wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen nach enzymatischem Verdau der Proben mit der Wiederfindungsrate ( $RS = RSaPMW / RSaRMW \times 100$ )

#### c) RS-Gehalt von wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen

Der RS-Gehalt von wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen, hergestellt durch die Umsetzung von Saccharose durch ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase wurde nach der unter Beispiel 2b) beschriebenen Methode ermittelt. Wurde zur Herstellung der wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane ein Proteinrohextrakt des *E. coli* Bakterienstammes DH5 $\alpha$ , der eine Nukleinsäuresequenz, kodierend eine Amylosucrase aus *Neisseria polysaccharea* (Potocki de Montalk et al., 1999, J. of Bacteriology 181, 357-381) exprimiert, eingesetzt, so betrug der RS Gehalt des erhaltenen wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukans 75% +/- 2%.

Wurde zur Herstellung der wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane ein Proteinrohextrakt des *E. coli* Bakterienstammes KV832 (Kiel et al., 1987 Mol. Gen. Genet 207: 294-301), der eine Nukleinsäuresequenz, kodierend eine Amylosucrase aus

*Neisseria polysaccharea* (Potocki de Montalk et al., 1999, J. of Bacteriology 181, 357-381) exprimiert, eingesetzt, so betrug der RS Gehalt des erhaltenen wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukans 91% +/- 2%.

## **Beispiel 2**

### **Bestimmung des Molekulargewichtes von wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen**

Das Molekulargewicht von wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen, hergestellt durch die Umsetzung von Saccharose durch ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase, wurde mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) bestimmt.

#### **a) Vorbereitung der Proben für die Durchführung der GPC**

1. Herstellung einer 1%igen Lösung der wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane in DMSO+90mM NaNO<sub>3</sub> (= entspricht dem verwendeten Eluenten in der GPC Analyse)
2. Lösen für ca. 30 Minuten bei 60°C und Schütteln
3. Einminütige Zentrifugation bei 8000 rpm in Tischzentrifuge
4. 1:10 Verdünnung im Eluenten
5. Injektion von 24 µl 1:10 Verdünnung

#### **b) GPC-Analyse**

Verwendete Komponenten des GPC Systems:

Pumpe: Dionex, P580

Autosampler: Dionex, AS50

Säulen: PSS (Vorsäule: PSS GRAM, 10 µ; Trennsäulen: PSS GRAM 3000, 10 µ und PSS GRAM 100, 10 µ)

Säulenofen: Dionex, Modell 585

Detektion: Shodex RI71

Die GPC Analyse wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Autosampler und Säulenofen bei 60°C

Eluent: DMSO + 90mM NaNO<sub>3</sub>

Eluentfluß: 0.7 ml/min

Die Steuerung erfolgte über die Software Chromeleon (Dionex) und die Auswertung der Daten Auswertung mit Hilfe der Software PSS WinGPC compact V.6.20.

c) Molekulargewichte der wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen

Die untersuchten wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane wiesen ein Molekulargewicht von 1500 bis 55.000 Dalton auf. Das Peakmaximum lag bei 9000 Dalton.

**Beispiel 3**

**Bestimmung der thermischen Stabilität der wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane mittels DSC Analyse**

Die thermische Stabilität der RS Produkte wurde mit Hilfe der Pyris Diamond DSC von Perkin Elmer ermittelt. Je 10 mg der RS Produkte wurden in Messkapseln eingewogen (Steel Pan Perkin Elmer Prod. Nr. 03190029), mit 30 µl deionisiertem Wasser (Millipore) versetzt und die Messkapseln nach Herstellerangaben versiegelt. Alle Proben wurden innerhalb von 12 Stunden vermessen. Eine leere Messkapsel diente als Referenz. Die Kalibrierung erfolgte mittels Indium Standard. Die DSC Messungen erfolgten in einem Temperaturbereich von 20-150 °C, bei einer Heizrate von 10°C pro Minute. Die Ermittlung von T<sub>0</sub>, T<sub>p</sub> und ΔH erfolgte mittels Pyrus Software (Vers.5). Die Angaben für ΔH sind auf die Trockengewichte der Proben bezogen, welche mittels Heizwaage ermittelt wurden. Jede Probe wurde auf diese Weise zweimal vermessen.



	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ Gefriertrocknung	<i>E. coli</i> KV832 Gefriertrocknung	<i>E. coli</i> KV832 Lufttrocknung
T <sub>0</sub>	78,3 °C	98,7 °C	92,7 °C
T <sub>P</sub>	101,3 °C	112,3 °C	114,2 °C
$\Delta H$	12,4 J/g	23 J/g	20 J/g

**Tabelle 1:** Mittels DSC Analyse ermittelte Werte für wasserunlösliche lineare Poly-alpha-1,4-D-Glukane

Wasserunlösliche lineare Poly-alpha-1,4-D-Glukane wurden entweder mit Proteinrohextrakt des *E. coli* Bakterienstammes DH5 $\alpha$ , der eine Nukleinsäuresequenz, codierend eine Amylosucrase aus *Neisseria polysaccharea* (Potocki de Montalk et al., 1999, J. of Bacteriology 181, 357-381) exprimiert oder mit Proteinrohextrakt des *E. coli* Bakterienstammes KV832 (Kiel et al., 1987 Mol. Gen. Genet 207: 294-301), der eine Nukleinsäuresequenz, codierend eine Amylosucrase aus *Neisseria polysaccharea* (Potocki de Montalk et al., 1999, J. of Bacteriology 181, 357-381) exprimiert, hergestellt. Die erhaltenen wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane wurden entweder gefriergetrocknet oder luftgetrocknet.

1. Verwendung von wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukanen als resistente Stärke (RS).
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane durch die Umsetzung einer wässrigen Saccharoselösung mit einem Enzym mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase gewonnen wurden.
3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung der wässrigen Saccharoselösung mit einem Enzym mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase *in vitro* erfolgt ist.
4. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung der wässrigen Saccharoselösung mit einem Enzym mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase *in planta* erfolgt ist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane einen nach der Methode von Englyst et al. bestimmten RS-Gehalt von mehr als 70 Gew.-% aufweisen.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane eine DSC Peaktemperatur zwischen 95°C und 125°C aufweisen.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane ein mittleres Molekulargewicht von  $1 \times 10^2$  g/mol bis  $10^5$  g/mol aufweisen.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane ein mittleres Molekulargewicht von  $1 \times 10^3$  g/mol bis  $3 \times 10^4$  g/mol aufweisen.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane ein mittleres Molekulargewicht von  $2 \times 10^3$  g/mol bis  $1.2 \times 10^4$  g/mol aufweisen.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die wasserunlöslichen linearen Poly-alpha-1,4-D-Glukane nicht retrogradiert wurden.

## Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von linearen alpha-1,4-Glukanen als resistente Stärke (RS) sowie ein Verfahren zur Herstellung resistenter Stärke, dadurch gekennzeichnet, dass man Saccharose mit einem Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase umsetzt.

641/EP000412090

